

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
29 septembre 2005 (29.09.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/090402 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07K 14/76, 14/765

(74) Mandataire : **CABINET LEPEUDRY**; 43, rue de la
Brèche aux Loups, F-75012 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/000416

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(22) Date de dépôt international :
23 février 2005 (23.02.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0402001 27 février 2004 (27.02.2004) FR

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **LAB-
ORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT
ET DES BIOTECHNOLOGIES** [FR/FR]; 3, avenue des
Tropiques, ZA de Courtaboeuf, F-91940 Les Ulis (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
BOULANGE, Paul [FR/FR]; 51, rue François Ler-
oux, F-91400 Orsay (FR). **CHTOUROU, Sami** [FR/FR];
20, avenue du Château, F-78990 Elancourt (FR). **BOYER,
Stéphane** [FR/FR]; 16, rue des Sorbiers, F-91470 Pec-
queuse (FR). **SCHMITTHAEUSLER, Roland** [FR/FR];
44, rue Louis de Funès, F-78180 Montigny Le Bretonneux
(FR). **PADRAZZI, Bruno** [FR/FR]; 2, rue de la Saône,
F-75014 Paris (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: ALBUMIN-PURIFICATION METHOD COMPRISING A NANOFILTRATION STEP, SOLUTION, AND COMPO-
SITION FOR THERAPEUTIC USE CONTAINING SAME

(54) Titre : PROCEDE DE PURIFICATON D'ALBUMINE COMPRENANT UNE ETAPE DE NANOFILTRATION, SOLUTION
ET COMPOSITION A USAGE THERAPEUTIQUE LA CONTENANT

(57) Abstract: The invention relates to an albumin-purification method comprising a step consisting in subjecting an aqueous albu-
min solution, with a concentration of between 15 g/l and 80 g/l and a pH of not less than 7, to nanofiltration in a temperature range
of between 15 °C and 55 °C. The invention also relates to: a virally-safe aqueous albumin solution which can be obtained using the
inventive method and in which the sites for the transport and binding of the active therapeutic ingredients of the albumin are available;
and an albumin composition for therapeutic use, which is obtained by adapting the albumin solution that is intended for clinical use.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé de purification d'albumine comprenant une étape consistant à soumettre une solution
aqueuse d'albumine, de concentration 15 g/l à 80 g/l et de pH non inférieur à (7), à une nanofiltration dans une plage de température
allant de 15 °C à 55 °C. L'invention concerne également une solution aqueuse d'albumine viralement sécurisée susceptible d'être
obtenue par la mise en œuvre du procédé, dans laquelle les sites de transport et de fixation de principes actifs thérapeutiques de
l'albumine sont disponibles et une composition d'albumine à usage thérapeutique obtenue par un traitement d'adaptation de ladite
solution d'albumine à un usage clinique.



WO 2005/090402 A1

Procédé de purification d'albumine comprenant une étape de nanofiltration, solution et composition à usage thérapeutique la contenant

5 La présente invention concerne un procédé de purification d'albumine comprenant une étape de nanofiltration, une solution et une composition à usage thérapeutique la contenant, susceptibles d'être obtenues par le procédé de l'invention.

10 L'albumine est une protéine majeure du plasma sanguin humain ou animal. Les usages cliniques de l'albumine, en tant que principe actif, nécessitent son extraction et sa purification, qui sont classiquement effectuées par des méthodes connues, telles que celles de Cohn et al (J. Am.
15 Chem. Soc., 68, 459, 1946) et Kistler et al. (Vox Sang., 7, 1962, 414-424), applicables de surcroît à une échelle industrielle.

Les besoins en albumine s'élèvent, selon les pays, à environ 100-300 kg par million d'habitants et il est par
20 conséquent nécessaire, à des fins cliniques, de disposer d'une albumine exempte de virus pathogènes et de tous contaminants, sources de maladies. Ainsi, la sécurité du point de vue des virus transmissibles par transfusion est assurée par des méthodes d'inactivation virale telle que
25 la pasteurisation à l'état liquide d'une composition d'albumine à 60°C pendant 10 heures en présence d'un stabilisant biologiquement compatible (caprylate et/ou tryptophanate de sodium). Cette sécurité sur le plan viral est établie depuis plus de 60 ans et la littérature ne
30 rapporte aucun cas de transmission avérée de virus, par exemple de l'hépatite B, A ou C, ou de VIH. Toutefois, certains auteurs ont mentionné quelques cas relatifs à la présence, après transfusion, de parvovirus B 19 dans des compositions d'albumine ou de produits dérivés de
35 l'albumine. En outre, il a également été rapporté un cas d'une composition d'albumine qui aurait induit la maladie

de Creutzfeld-Jacob chez une patiente ayant subi une transplantation hépatique (Créange A., 1995).

Certaines études ont révélé une série d'effets indésirables survenant postérieurement à une transfusion
5 d'albumine attribuée à la présence de substances de nature lipopolysaccharidique (pyrogènes) présentes en quantités inférieures au seuil de détection des méthodes réglementaires, mais pouvant apparaître à l'occasion de la perfusion de grands volumes d'albumine (échanges
10 plasmatiques, par exemple).

D'autres effets secondaires sont liés à la présence de polymères d'albumine apparaissant au cours de sa purification et surtout au cours de l'étape de pasteurisation mentionnée précédemment. D'autres encore
15 sont liés à la présence de stabilisants ajoutés pour empêcher une dénaturation thermique liée à la pasteurisation et ceci particulièrement chez des patients présentant un terrain allergique.

Afin de pallier le risque de présence d'agents
20 infectieux transmissibles, il a été proposé de produire une albumine dite "recombinante", selon le brevet US 6 210 683 : le gène de l'albumine est introduit dans une cellule-hôte, levure ou bactérie, à potentiel de multiplication élevé. Cette cellule-hôte produit à son
25 tour de l'albumine dans le milieu de culture ou dans son cytoplasme. Celle-ci est ensuite séparée des cellules par extraction et purifiée. Cependant, la présence de protéines de la cellule-hôte est souvent détectée et les méthodes de purification doivent donc être très
30 résolutives, ce qui se fait en général au détriment du rendement. Ainsi, le coût de production d'une albumine recombinante peut alors se révéler trop élevé en comparaison avec celui engendré pour une production d'albumine à partir du plasma.

35 Une autre possibilité pour contourner les inconvénients énumérés ci-dessus, consiste à mettre en

oeuvre des techniques de filtration très largement utilisées pour la rétention virale et de contaminants chimiques, bactériologiques etc. sur filtres qualifiés pour des porosités variables. On peut citer à titre
5 d'exemple l'ultrafiltration qui a été utilisée ponctuellement en l'absence d'autres moyens d'élimination virale pour garantir la sécurité biologique d'une protéine d'extraction, telle que l'hormone de croissance (hGH). La technique requiert un flux tangentiel et n'est destinée
10 qu'à des solutions protéines ou des polypeptides d'un poids moléculaire inférieur ou égal à 65 kDa et à faible concentration. Ceci laisse subsister une probabilité de passage de virus en raison de l'imprécision de fabrication des membranes de filtration. En outre, on observe un
15 colmatage du filtre en fonctionnement frontal aboutissant à un arrêt du flux de filtrat. Le colmatage du filtre est d'autant plus rapide que la concentration en protéine ou polypeptide augmente.

Pour accroître davantage la sécurité virale de
20 solutions biologiques, il est envisageable de mettre en œuvre la nanofiltration, technique de choix pour la rétention de particules de dimensions supérieures ou égales à 15-20 nm environ. Cette rétention particulière sur filtres qualifiés, est aisément réalisée à grande
25 échelle pour des solutions aqueuses ou contenant des solutés de faible taille, peptides, acides aminés, ions minéraux ou composés organiques inférieurs à environ 5 kDa.

La nanofiltration de solutés de grande taille a pu
30 être effectuée par exemple pour des facteurs de la coagulation sanguine, le facteur IX et facteur XI. L'article de Burnouf-Radosevich et al (Vox Sang., 67, p. 132-138, 1994 en référence avec Burnouf et al, Vox Sang., 57, p. 225-232, 1989 et Burnouf-Radosevich et al, Transfusion, 22, p. 861-867, 1992) montre que les
35 conditions opératoires de la nanofiltration impliquent de

faibles volumes de concentrés de facteur IX et facteur XI (3-4 litres) dont les concentrations en protéines ne dépassent pas 1 g/l (respectivement 0,21 g/l et 0,75 g/l).

5 Au cours du processus de la nanofiltration, il se produit en effet une accumulation des solutés de grande taille sur le filtre, ce qui aboutit au ralentissement du débit du filtrat jusqu'au colmatage complet du filtre.

Les solutions techniques à ce colmatage consistant à mettre en oeuvre une nanofiltration tangentielle, à
10 augmenter la pression, à changer la direction des flux, ne s'avèrent pas efficace car celui-ci est progressif et irréversible. Un développement à l'échelle industrielle s'en trouve donc fortement compromis, car requérant l'utilisation de très nombreux filtres et des volumes de
15 solutions à filtrer très importants, ce qui engendre un coût prohibitif et des durées de production anormalement accrues.

Pour éviter le phénomène de colmatage, une solution consiste à régler les paramètres physico-chimiques
20 influant sur le rendement de récupération de solutés, tout en évitant le passage de contaminants à travers le filtre. Les variations de ces paramètres, tels que la force ionique, la nature du soluté à filtrer et le pH de la solution à filtrer, ainsi que les conditions opératoires
25 de la filtration, tels que le débit, la pression, ont fait l'objet de très nombreuses études. Celles citées par exemple dans les publications scientifiques de C. Wallis et al, Ann. Rev. Microbiol., 33, p. 413-437, 1979 et S. Jacobs, Methods of Biochemical Analysis, 22, p.307-350,
30 1974, montrent que l'effet de chaque paramètre pris individuellement peut conduire à une augmentation ou à une diminution de l'efficacité de rétention virale et du rendement de récupération de solutés et que la combinaison de plusieurs paramètres n'est pas, de façon systématique,
35 en faveur d'une synergie des effets d'amélioration des conditions de filtration.

Compte tenu de l'importance que revêt l'albumine sur le plan clinique et des besoins sans cesse croissants, il apparaît nécessaire de mettre à la disposition des patients une albumine présentant un degré de sécurité et de tolérance supérieur à celui des albumines actuellement disponibles, tout en optimisant les conditions de sa production à grande échelle. A cette fin, la Demanderesse s'est donc attachée à mettre au point un procédé de purification de l'albumine comprenant une étape de nanofiltration de solutions d'albumine concentrées répondant à ces objectifs. La présente invention vise ainsi à offrir une solution correspondant à un bon compromis entre les deux critères que constituent l'efficacité de rétention virale et/ou d'autres macromolécules susceptibles d'induire des pathologies ou des effets secondaires chez les patients, et le rendement de récupération de l'albumine, l'importance relative de ces deux critères étant fonction de l'application voulue.

Par conséquent, l'invention concerne un procédé de purification d'albumine caractérisé en ce qu'il comprend une étape consistant à soumettre une solution aqueuse d'albumine, de concentration 15 g/l à 80 g/l et de pH non inférieur à 7, à une nanofiltration dans une plage de température allant de 15°C à 55°C.

Ainsi, la Demanderesse a trouvé de façon surprenante qu'une combinaison judicieuse des valeurs du pH, de la concentration d'albumine, et de la température (donc de la viscosité) de la solution aqueuse d'albumine soumise à l'étape de nanofiltration, permettait d'atteindre une optimisation efficace du rendement de récupération d'albumine et des taux de réduction virale, supérieur à la limite fixée par les autorités de contrôle (4 log) et d'autres macromolécules indésirables. Il a été mis en évidence que la nanofiltration selon les conditions de l'invention permettait la filtration de quantités supérieures à 5 kg d'albumine par m² de filtre,

définissant ainsi la charge protéique, tout en optimisant la durée de celle-ci et le débit du filtrat. Les solutions d'albumine nanofiltrées présentent un degré de sécurité très élevé vis-à-vis de contaminants particuliers de
5 taille par exemple d'au moins 13 nm environ, par exemple les virus, tels que les virus non-enveloppés, les prions, les polymères d'albumine (tétramères-décamères) engendrés lors d'étapes de sa fabrication ou au cours de la pasteurisation à 60°C, les lipopolysaccharides en
10 micelles, les acides nucléiques et les protéines agrégées. Les solutions aqueuses d'albumine ainsi obtenues constituent également un produit intermédiaire pouvant être mis en forme pharmaceutique pour les applications cliniques (voir plus loin).

15 Dans le cadre de l'invention, les solutions aqueuses d'albumine représentent des solutions exemptes de tous réactifs mis en œuvre lors de différentes étapes classiques de purification ou de fabrication de l'albumine, tels que, par exemple, le polyéthylèneglycol
20 (PEG), l'éthanol, les sels organiques (caprylate de sodium etc.) et inorganiques. Ces divers réactifs sont éliminés de la solution d'albumine par des traitements connus, tels que la diafiltration, l'ultrafiltration, la dialyse etc. Comme indiqué ci-dessus, la présence de tels réactifs,
25 voire même les variations de leur teneur respective d'un échantillon à l'autre, peut aboutir à une efficacité de rétention virale et de rendement de récupération d'albumine défavorables.

Ainsi, la Demanderesse a en outre trouvé de manière
30 surprenante que la diminution de la force ionique était corrélée avec une meilleure réduction virale.

Il convient de préciser que dans le contexte de l'invention, les solutions aqueuses d'albumine soumises à la nanofiltration peuvent toutefois présenter une force
35 ionique inférieure à un seuil maximal lié, dans ce cas, à la valeur du pH basique maximale permise. Cette valeur

correspond typiquement à environ 11,5. L'ajustement du pH doit en particulier être réalisé de sorte que la variation de la force ionique engendrée par l'addition d'un ajusteur de pH dans la solution aqueuse d'albumine ne soit que très
5 faible, voire négligeable. De tels ajusteurs de pH seront choisis préférentiellement parmi les bases fortes de métaux alcalins, tels que NaOH et KOH, et parmi les acides forts, tels que HCl, en respectant les critères énoncés ci-dessus. Il est en outre préférable d'éviter des
10 ajusteurs de pH à base de composés organiques, tels que des bases organiques.

Ainsi, à titre d'exemple, lorsque les solutions aqueuses d'albumine nécessitent un ajustement du pH jusqu'à la valeur d'environ 11,5, effectué par ajout de
15 NaOH 0,5 M, ces solutions obtenues auront donc une force ionique d'environ 0,0032.

Le procédé de l'invention peut être mis en oeuvre en utilisant tous types de dispositifs de nanofiltration frontale ou tangentielle, en particulier de nanofiltration
20 frontale, connus de l'homme du métier. Actuellement, les filtres utilisés ont une taille de pore inférieure à 100 nm.

L'étape de nanofiltration selon l'invention est de préférence effectuée sur des filtres qualifiés pour une
25 porosité d'au moins 13 nm et représentent, par exemple, les filtres nanométriques de porosité de 15 ± 2 ou 20 ± 2 nm disponibles dans le commerce, se présentant sous la forme de membranes plissées, de membranes planes ou de fibres creuses. A titre d'exemple, on peut citer les
30 nanofiltres en cellulose régénérée tels que PLANOVA® 15 nm et de surface $0,01 \text{ m}^2$ (provenant de chez Asahi, Japon, ou les filtres à virus PALL (Etats-Unis d'Amérique) donnés pour 20 ou 50 nm.

On peut utiliser toutes sources de matière première
35 d'albumine (produit pur lyophilisé, concentré etc.) et notamment celles issues du fractionnement du plasma

sanguin humain ou animal par les méthodes de Cohn et al (J. Am. Chem. Soc., 68, 459, 1946) ou Kistler et al. (Vox Sang., 7, 1962, 414-424).

5 Le pH de la solution aqueuse d'albumine est de préférence situé dans la plage de valeurs allant d'environ 7,8 à environ 11,5, et, de façon plus préférée, de 9 à 10,5. Des valeurs de pH supérieures à environ 11,5 dénaturent de façon irréversible l'albumine.

10 Le procédé de l'invention est de préférence mis en oeuvre avec des solutions aqueuses d'albumine de concentration située dans la plage allant de 40 à 60 g/l et dans une plage de températures allant de 30 à 55°C.

Selon l'invention, le procédé peut en outre comprendre une étape d'ajout d'un sel ou mélange de sels
15 pharmaceutiquement acceptables dans la solution aqueuse d'albumine pour obtenir une solution de force ionique supérieure à 0.0032 et, de préférence, située dans la plage allant de 0,01 à 0,55, plus préférentiellement, de 0,01 à 0,3, de façon encore plus préférentielle, de 0,05 à
20 0,15, et, en particulier, de 0,1 et 0,13. On utilise préférentiellement les sels de métaux alcalins et, en particulier, le chlorure de sodium présent en quantité conférant à la solution d'albumine une force ionique de 0,15.

25 Bien que toute albumine convienne comme matière première, son origine peut toutefois constituer un facteur jouant un rôle sur le rendement de la nanofiltration selon qu'elle contienne ou non de stabilisants thermiques ou qu'elle ait été traitée ou non par la chaleur (choc
30 thermique ou pasteurisation). Ainsi, l'utilisation dans le procédé selon l'invention d'une albumine obtenue par extraction éthanolique selon Cohn et al ou Kistler et al citées ci-dessus, et purifiée par chromatographie d'échange d'ions ou d'affinité, peut donner lieu à un
35 accroissement du rendement de récupération de l'albumine et/ou une diminution de la durée de filtration.

La nanofiltration de la solution aqueuse d'albumine peut être effectuée en deux étapes successives sur respectivement deux filtres de porosité décroissante. Avantageusement, ces deux étapes successives sont
5 effectuées respectivement sur des filtres de porosité de 23 à 50 nm et 15 ou 20 nm.

Lorsque des filtres PLANOVA® 15 nm et de surface 0,01 m² sont utilisés, le procédé de l'invention est mis en oeuvre à des pressions non supérieures à 1 bar, celles-ci
10 étant de préférence situées dans la plage allant de 0,2 à 0,8 bar.

Le procédé peut comprendre une étape ultérieure de traitement spécifique connu destiné à rendre les solutions aqueuses d'albumine appropriées à divers usages
15 thérapeutiques conformément à la Pharmacopée européenne, tel que leur ajustement au pH physiologique le cas échéant, à l'isotonie dans le cas d'une injection intraveineuse et à une concentration saline physiologiquement acceptable, et/ou de conditionnement par
20 exemple sous forme liquide ou lyophilisée.

L'invention concerne également une solution aqueuse d'albumine viralement sécurisée susceptible d'être obtenue par la mise en oeuvre du procédé de l'invention, dans laquelle les sites de transport et de fixation de
25 principes actifs thérapeutiques de l'albumine sont disponibles. Cette solution d'albumine est en outre caractérisée en ce qu'elle est exempte de macromolécules d'une constante de sédimentation, selon Svedberg Ph. et al (Ultracentrifüg, 7^{ème} édition, Ed. Steinkopff, Dresden,
30 1940), supérieure à 7 S (soit de masse moléculaire d'environ 160 kDa). En particulier, cette solution d'albumine contient au plus 1% de polymères d'albumine de taille inférieure à 100 nm, de préférence inférieure à 20 nm.

35 L'invention concerne en outre une composition d'albumine à usage thérapeutique obtenue par un traitement

d'adaptation de ladite solution d'albumine selon l'invention à un usage clinique.

La sécurisation obtenue pour ces compositions d'albumine à usage thérapeutique permet de supprimer l'étape de pasteurisation source d'inconvénients énumérés plus haut et donc l'adjonction de stabilisants habituels de protection contre les effets thermiques, qui se fixent en outre sur les sites de l'albumine empêchant par conséquent l'albumine de fixer des molécules d'intérêt.

10 L'albumine de ces compositions selon l'invention conserve donc son potentiel de fixation et de transport de divers principes actifs et atténue par cette liaison leur toxicité ou en augmente la biodisponibilité par un effet retard.

15 On peut également citer d'autres applications pour lesquelles les compositions d'albumine selon l'invention peuvent être proposées :

- stabilisation vis-à-vis de la dénaturation et de l'oxydation de protéines de faible concentration (inférieure au g/l) et d'activité spécifique élevée, telles que le facteur VIII, le facteur von Willebrand et leur équivalent recombinant, d'immunoglobulines spécifiques, d'anticorps monoclonaux, de vaccins (viraux, bactériens, protéiques, ADN), d'allergènes pour la
- 20 détection d'allergies chez des patients sensibles, de cytokines ou encore d'hormones peptidiques ;

- excipient pour milieu de propagation et d'incubation pour les fécondations "in vitro" d'ovocytes humains ; et
- protéines standard témoin pour servir de placebo
- 30 dans les études cliniques.

L'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples qui suivent, en référence aux dessins annexés, sur lesquels:

- la figure 1 est une illustration d'un dispositif de
- 35 mise en oeuvre du procédé de l'invention, et
- les figures 2 à 6 sont des tracés des variations du

débit instantané de filtration (ml/min) en fonction de la durée de nanofiltration, obtenus en fonction de différents paramètres.

5 Exemple 1

1.1 Méthodologie de mise en oeuvre du procédé de nanofiltration (figure 1)

Un dispositif de filtration 1 comprenant un filtre PLANOVA[®] 15 nm et de surface 0,01 m² (provenant de chez
10 Asahi, Japon) est équipé de tuyaux 10, 11 en sortie de rétentat (solution avant filtration) et en entrée et sortie de filtrat (solution après filtration), en matériaux compatibles sur le plan pharmaceutique, de diamètres d'environ 5 mm, fermés par des pinces à clamber.
15 Le dispositif est placé sur un statif (non représenté) en position verticale à l'aide de pinces.

L'entrée du filtre de 15 nm est raccordée, par le tuyau 10, à un récipient pressurisable 12 dont la pression est mesurée grâce à un manomètre numérique 13 branché sur
20 le circuit amont du filtre.

Avant utilisation, un test d'intégrité est mis en oeuvre sur le filtre de 15 nm suivant la procédure définie par le fabricant : "Test de fuite à l'air lors de test d'intégrité pré et post filtration des filtres PLANOVA[®]
25 15, 35, 75 nm".

On procède ensuite au rinçage de l'installation. A cet effet, l'arrivée d'air comprimé 14 est branchée sur le réservoir pressurisable 12 rempli d'un volume d'environ 100 ml de NaCl à 9 g/l. Le flacon est pressurisé
30 progressivement jusqu'à obtenir 0,5 bar à l'entrée du filtre de 15 nm. Le filtre de 15 nm est rempli en purgeant l'air par la sortie rétentat, sans remplir l'extérieur des fibres constituant le filtre. La sortie basse est ouverte et est reliée à une cellule de détection 15 de mesure de
35 la densité optique connectée à un enregistreur 16, la sortie filtrat haute restant clampée. Le filtrat de

rinçage est recueilli dans un récipient 17 sur une balance 18 reliée et pilotée par un microordinateur 19 qui enregistre l'augmentation du poids de filtrat, ce qui permet de suivre le débit instantané de filtration. Le
5 temps nécessaire pour filtrer un volume minimum de 40 ml à 0,5 bar est mesuré, puis en on déduit le débit moyen en ml/min. Le montage est dépressurisé progressivement et toutes les sorties sont clampées. Selon la température de la nanofiltration voulue, l'installation peut être placée
10 à température ambiante (environ 20°C) ou dans une étuve dont la température d'utilisation est comprise entre 25 et 60°C.

1.2 Solutions d'albumine

15 On utilise comme solutions aqueuses d'albumine de référence, des solutions à 20 g/l, à pH 7, comprenant du NaCl à 9 g/l. La matière première d'albumine utilisée, notée A, hormis pour les exemples 6 et 9 ci-après, est celle obtenue par fractionnement du plasma humain selon
20 Kistler et al ayant ensuite subi un traitement d'élimination de l'alcool, de diafiltration et de concentration par ultrafiltration. Il convient de préciser que le fractionnement ci-dessus de diverses sources de plasma conduit généralement à une albumine, dont les
25 caractéristiques peuvent varier en raison de la nature biologique de la matière première. Par conséquent, celle-ci peut donc influencer sur la durée de nanofiltration, le rendement etc.

On prépare des solutions aqueuses d'albumine à
30 filtrer, à partir des solutions de référence ci-dessus, par modification de leurs caractéristiques telles que la concentration, le pH et la force ionique. Leurs volumes sont ajustés de façon à obtenir les charges protéiques voulues. Selon les exemples, les concentrations en
35 albumine varient de 15 g/l à 80 g/l. L'ajustement du pH est effectué par ajout de NaOH ou de HCl 0,5 M et celui de

la force ionique, par ajout de chlorure de sodium. Toutes les solutions d'albumine sont ensuite préfiltrées sur filtres de 0,2 μm disponibles dans le commerce.

5 1.3 Nanofiltration d'une solution d'albumine

Une fois la filtration d'un volume prédéterminé d'albumine achevée, l'entrée du filtre est fermée. Un volume d'eau purifiée pour injection (PPI) de rinçage est introduit dans le réservoir 12 remis sous pression et le
10 filtre est purgé. Le filtrat est recueilli jusqu'à diminution sensible de la densité optique suivie sur l'enregistreur 16. Le circuit aval est ensuite purgé afin de recueillir la fin du filtrat. Des prélèvements sont effectués sur le filtrat et sont soumis à des contrôles
15 analytiques ultérieurs, tels que les dosages en polymères, le titre viral etc. On mesure aussi la durée de filtration nécessaire d'un volume de solution d'albumine de façon à obtenir une charge protéique fixée et le rendement de filtration représenté par le quotient entre la quantité en
20 albumine du filtrat et celle du rétentat.

Après utilisation, un test d'intégrité est mis en oeuvre sur le filtre de 15 nm suivant la procédure définie par le fabricant : "Test de fuite à l'air lors de test d'intégrité pré et post filtration des filtres PLANOVA®
25 15, 35, 75 nm".

Exemple 2

On effectue deux essais préliminaires destinés à évaluer la faisabilité de la nanofiltration, en termes de
30 charge protéique, de durée et de rendement, lorsque celle-ci est mise en oeuvre avec des solutions d'albumine A (exemple 1), filtrées à 20°C et sous une pression de 0,5 bar. Des volumes de solutions A sont préparés pour une charge protéique de 0,5 kg/m² et 1 kg/m². Les résultats
35 sont montrés dans le Tableau 1.

Tableau 1

Solutions	Charge protéique (kg/m ²)	Durée de filtration (min)	Rendement protéique (%)
A	0,5	190	98
A	1	282	99

Ces résultats montrent que selon les conditions
5 fixées, la nanofiltration de solutions d'albumine A permet
une charge protéique de 1 kg/m², sans colmatage du filtre,
et avec un excellent rendement. On observe également que
le fait de doubler la charge protéique n'entraîne pas une
durée de nanofiltration deux fois plus importante.

10 Les résultats de ces essais ont donc incité la
Demanderesse à envisager la nanofiltration de solutions
d'albumine de façon à obtenir des charges protéiques plus
importantes en optimisant le cas échéant certains
paramètres influant sur celle-ci.

Exemple 3

L'influence du pH des solutions d'albumine sur les
durées de filtration et les rendements pour obtenir une
charge protéique de 4 kg/m² est établie en considérant,
20 comme matière première, un lot d'albumine A. Cinq
solutions d'albumine à 40 g/l, notées A1 à A5, sont
préparées dans une solution de NaCl à 9 g/l puis
respectivement ajustées à un pH de 5, 7, 9, 9,5 et 10 par
des solutions de HCl 0,5 M ou de NaOH 0,5 M, et sont
25 soumises à une nanofiltration. Les essais de
nanofiltration sont effectués à 20°C sous une pression de
0,5 bar. La figure 2 montre les courbes de débit de
filtration (ml/min) en fonction de la durée de la
nanofiltration pour chacune des solutions considérées.

30 L'analyse de ces courbes montre que pour la solution
A1 (pH 5), il se produit une diminution rapide du débit

et, par conséquent, un colmatage du filtre. Pour les solutions A2 et A3, on constate une diminution du débit initial plus rapide pour la solution A3, mais avec des variations tout à fait acceptables, sans l'observation
5 d'un colmatage après plus de 25 heures de filtration. Les meilleurs résultats sont obtenus pour les solutions A4 et A5, c'est-à-dire à pH 9,5 et 10, avec des débits initiaux respectifs plus élevés et des durées de filtration plus faibles que pour celles des solutions A2 et A3, la
10 solution A4 présentant un débit initial le plus optimal.

Exemple 4

Dans cet exemple, l'effet conjoint du pH et de la température de façon à obtenir une charge protéique de 4
15 kg/m² est testé sur les solutions A3 et A4, définies à l'exemple 3, à 20°C et à 30°C. Les essais de nanofiltration sont effectués sous une pression de 0,5 bar. Les durées de filtration ainsi obtenues sont indiquées au Tableau 2. La figure 3 rassemble les courbes
20 de débit de filtration (ml/min) en fonction de la durée de la nanofiltration pour chacune des solutions considérées.

Tableau 2

Solution	Température (°C)	Durée de filtration (h)	rendement (%)
A3	20	11	98
A3	30	9,5	98
A4*	20	12,75 ± 0,75	98
A4	30	9	98

25 * : deux essais de nanofiltration

A 30°C, on obtient les durées de filtration les plus faibles avec des courbes de débit pratiquement superposables (solutions A3 et A4) sans l'observation d'un

colmatage progressif du filtre. A 20°C, les débits de filtration sont un peu plus faibles qu'à 30°C.

Exemple 5

5 Cet exemple est destiné à montrer l'influence conjointe de la concentration en albumine et de la température sur la nanofiltration pour obtenir une charge protéique de 8 kg/m², en analysant les durées de filtration obtenues (Tableau 3) et les courbes de débit
10 (figure 4). Pour cette série d'essais, on considère les solutions A4 (40 g/l), A6 (60 g/l) et A7 (80 g/l), toutes trois comprenant du NaCl à 9 g/l, pH 9,5, qui sont ensuite soumises à une nanofiltration effectuée sous une pression de 0,5 bar.

15

Tableau 3

Solutions	Température (°C)	Durée de filtration (h)	Rendement (%)
A4	20	24,6	98
A4	30	19,5	98
A6	20	22,5	98
A6	30	28,4	98
A7	20	31	98

L'analyse des résultats du Tableau 3 et de la figure 4
20 montre que l'on peut charger le filtre par 8 kg/m² sans colmatage. En particulier, les conditions optimales de filtration sont obtenues pour la solution A4 à 30°C. Pour la solution A6, le débit initial de filtration à 30°C est plus grand qu'à 20°C avec en outre une durée de filtration
25 plus longue. Ces résultats ont donc incité à considérer pour la solution la plus concentrée A7 une température de nanofiltration de 20°C. Dans ces conditions, la durée de filtration est la plus longue et le débit initial le plus

faible.

Exemple 6

Trois essais de nanofiltration sont effectués avec des solutions préparées à partir de deux matières premières d'albumine différentes. La première représente l'albumine A et la deuxième, l'albumine A purifiée par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions (dénommée A'). Pour cette série d'essais, on considère les solutions A4 et A6 de l'exemple 5, et A'1 (60 g/l, NaCl à 9 g/l, pH de 9,5) qui sont ensuite soumises à une nanofiltration effectuée à 20 et 30°C, sous une pression de 0,5 bar et de façon à obtenir une charge protéique de 8 kg/m². Le Tableau 4 montre les durées de filtration et le rendement. La figure 5 montre les courbes de débit de filtration (ml/min) en fonction de la durée de la nanofiltration pour chacune des solutions considérées.

Tableau 4

20

Solutions	Température (°C)	Durée de filtration (h)	Rendement (%)
A4	30	18,5	98
A6	20	27,5	98
A'1	20	17	98

La durée de la nanofiltration pour A'1 est la plus courte. Cependant, lorsqu'on opère avec la solution A4, on obtient le débit initial le plus optimal.

25

Exemple 7

L'effet de la variation de la force ionique de solutions d'albumine sur les durées de filtration et les rendements est étudié pour trois solutions d'albumine A à 40 g/l, respectivement préparées dans de l'eau purifiée

30

pour injection (solution A8), dans une solution de NaCl à 9 g/l (solution A2 ; force ionique 0,15) et de NaCl à 30 g/l (solution A9 ; force ionique 0,5), toutes trois étant à pH 7. Les essais de nanofiltration sont effectués à 20°C sous une pression de 0,5 bar, de façon à obtenir une charge protéique constante de 4 kg/m². Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau 5.

Tableau 5

Solutions	Concentration en NaCl (g/l)	Durée de filtration (h)	Rendement (%)
A8	0	24,5	98
A2	9	18,7	98
A9	30	22	98

Le meilleur résultat en termes d'optimisation de la durée de filtration et du rendement est obtenu pour une force ionique de 0,15, proche de celle correspondant à l'isotonie. Ce résultat est confirmé par un suivi de l'augmentation de poids filtré qui permet le tracé des variations du débit de filtration (ml/min) en fonction de la durée de la nanofiltration des solutions étudiées (Figure 6). Dans cet exemple, on constate que l'augmentation de la concentration en NaCl jusqu'à 30 g/l ne diminue pas le temps de filtration.

Exemple 8

Cet exemple est destiné à illustrer l'influence des variations de la charge protéique et de la pression de nanofiltration sur les durées de filtration et les rendements en produits obtenus. A cette fin, on considère les deux solutions d'albumine A (Exemple 2) et A2 (pH 7). Les résultats figurent au Tableau 6.

Tableau 6

Solutions (g/l)	Charge protéique (kg/m ²)	Pression (bar)	Durée de filtration (min)	Rendement (%)
A2	2	0,5	355	100
A	2	0,8	457	98
A2	4	0,5	1350	98
A2	4	0,8	1730	98

Ces résultats indiquent que pour les solutions A et
 5 A2, une augmentation de la pression engendre des durées de
 filtration plus élevées et ceci malgré le fait que la
 solution A soit moins concentrée que la solution A2. Les
 résultats obtenus pour les solutions A2 montrent que les
 filtres PLANOVA[®] 15 nm présentent une capacité ou charge
 10 protéique de 4 kg/m² et qu'une augmentation de pression ne
 diminue pas le temps de filtration.

Exemple 9

Cet exemple est destiné à montrer la possibilité de
 15 mise en oeuvre de la nanofiltration à l'échelle
 industrielle en utilisant des filtres PLANOVA[®] 15 nm de 1
 m² de surface. L'albumine utilisée est obtenue par
 fractionnement selon la méthode de Kistler et al et est
 rendue de qualité thérapeutique par chauffage à 60°C
 20 pendant 10 h en présence d'un stabilisant adéquat, selon
 les exigences de la Pharmacopée européenne. L'albumine B
 ainsi obtenue est ensuite mélangée dans un tampon
 comprenant : 0,01 M de citrate trisodique, 0,12 M de
 glycine, 0,016 M de L-lysine, 0,001 M de chlorure de
 25 calcium et 0,17 M de chlorure de sodium, dont le pH vaut
 7-7,5. La concentration finale des solutions d'albumine
 est de 20 g/l. Diverses solutions ainsi obtenues, après
 avoir été préfiltrées sur filtres de 0,2 µm, sont soumises
 à une nanofiltration décrite à l'exemple 1, à température

ambiante et sous une pression de 0,5 bar. Les volumes de solution B percolés à travers le filtre sont déterminés de façon à obtenir une charge protéique de 120 g/m². Les mêmes essais de nanofiltration sont effectués en considérant des filtres de 0,01 m². Le Tableau 7 rassemble les résultats de durées de filtration et de rendement obtenus pour les deux filtres, et ceux-ci constituent les valeurs moyennes de 3 essais.

10 Tableau 7

Solutions B	Durée de la filtration (h)	Rendement (%)
Filtre de 0,01 m ²	3,1 ± 0,1	87 ± 4
Filtre de 1 m ²	2,5 ± 0,1	83 ± 1

Les résultats obtenus montrent que l'utilisation de filtres de 1 m² de surface conduit à une durée de filtration plus faible par rapport à celle obtenue avec des filtres de 0,01 m² de surface mais avec une très légère baisse du rendement de filtration.

Exemple 10

20 Les mêmes solutions B et conditions opératoires de l'exemple 9 sont reprises dans le but de mesurer la réduction du taux de polymères après la nanofiltration (Tableau 8).

Tableau 8

Solutions B	Taux de polymères avant filtration (%)	Taux de polymères après filtration (%)
Filtre de 0,01 m ²	3,1	0,47 ± 0,13
Filtre de 1 m ²	4,3 ± 0,7	0,38 ± 0,05

Il convient de noter que le traitement de
5 pasteurisation de l'albumine engendre des polymères dont
le pourcentage reste toutefois inférieur à la limite de 5%
préconisée par la Pharmacopée européenne (4ème édition,
chapitre "solution d'albumine humaine", page 642). Les
essais de nanofiltration effectués sur les deux surfaces
10 de filtres considérés, permettent la réduction du taux de
polymères d'un facteur d'environ 10 dans les deux cas.

Exemple 11

Afin de montrer l'influence de la variation des
15 conditions opératoires de mise en oeuvre de la
nanofiltration (surface du filtre, pression et
température) et des paramètres physico-chimiques de
solutions d'albumine (pH, composition du tampon) sur le
taux de réduction virale, des virus ont été introduits
20 dans différentes solutions d'albumine A (20 g/l) qui ont
été ensuite soumises à des essais de nanofiltration. Les
essais sont effectués en infectant les solutions
d'albumine par du virus bactériophage Phi-X 174, dont les
suspensions sont réalisées selon la norme AFNOR NFT 72-181
25 (décembre 1989). Ce virus constitue un bon marqueur du
filtre de 15 nm, sa taille étant comprise entre 25 et 30
nm, ce qui correspond aux virus non enveloppés
transmissibles à l'homme tels que le parvovirus B19 dont
l'inactivation par pasteurisation n'est pas satisfaisante.

Les résultats obtenus sont montrés au Tableau 9.

Tableau 9

Surface du filtre (m ²)	Pression (bar)	T (°C)	Osmolalité (mosm)	Composition du tampon	pH	Réduction virale (Δ log)
0,01	0,5	35	280	NaCl : 0,15 M	7,2	5,9
0,001	0,5	35	280	NaCl : 0,15 M	7,2	6,5
0,001	0,2	35	280	NaCl : 0,15 M	7,2	> 5,0
0,001	1,0	35	280	NaCl : 0,15 M	7,2	4,9
0,001	0,5	26	280	NaCl : 0,15 M	7,2	> 5,5
0,001	0,5	35	280	NaCl : 0,15 M	4,1	> 6,0
0,001	0,5	35	555	NaCl : 0,30 M	7,2	4,2
0,001	0,5	35	610	NaCl : 0,15 M ; Saccharose : 100 g/l	7,2	> 6,3
0,001	0,5	35	335	Na ₂ SO ₄ : 0,15 M	7,2	3,7
0,001	0,5	35	280	NaCl : 0,15 M Tween 80 : 0,06 %	7,2	> 6,5

L'analyse de ces résultats montre pour les variations des conditions opératoires que :

- la seule variation de la surface du filtre et celle de la température, quelque soit la solution d'albumine considérée, n'ont quasiment pas d'influence sur le taux de réduction virale ;

- une augmentation de la pression de 0,5 bar à 1,0 bar a une influence défavorable sur le taux de réduction virale qui reste toutefois élevé ($> 4 \log$).

Les variations des paramètres physico-chimiques des solutions d'albumine A montrent que:

- la présence d'un détergent (Tween[®] 80) et d'un composé non ionique (le saccharose), et une variation du pH, n'ont quasiment pas d'influence sur le taux de réduction virale ;

- en revanche, le remplacement du NaCl par un sel divalent, le sulfate de sodium, a une influence négative sur ce taux qui devient inférieur au seuil autorisé par les autorités de contrôle. Le même phénomène est observé lorsqu'on augmente la concentration en NaCl (de 0,15 M à 0,3 M) bien que le taux de réduction soit satisfaisant.

Exemple 12

Les propriétés de l'albumine A nanofiltrée, sans stabilisant, dans le transport et la fixation de médicaments, ont été étudiées en les comparant avec celles obtenues pour deux lots différents d'albumine A pasteurisée en présence de caprylate de sodium.

On dispose, à cet effet, de trois solutions A4 (exemple 3) dont une est nanofiltrée dans les conditions de l'invention. Celles-ci sont ensuite mises en forme pharmaceutique dans un tampon phosphate 0,07 M, pH 7,4, de façon à obtenir des compositions d'albumine, notées A'4, A''4 et A'''4, de concentration de 2,5 g/l. Les compositions d'albumine A'4 et A'''4, non nanofiltrées, ont été respectivement pasteurisées en présence de

caprylate de sodium. On prélève un échantillon de 1 ml de chacune des compositions et on y ajoute respectivement un volume compris entre 10 μ l et 1000 μ l d'une solution alcoolique mère de [14 C]warfarine et de [14 C]diazepam à 0,1
5 M, deux principes actifs de la classe respective des anticoagulants et des neurotropes, de façon à obtenir des concentrations variables en ces principes actifs dans les compositions d'albumine considérées. L'ensemble est ensuite homogénéisé.

10 L'étude des propriétés de l'albumine dans la fixation des deux principes actifs ci-dessus est basée sur la méthodologie de la dialyse à l'équilibre, connue de l'homme du métier, dont le principe est résumé ci-après. On se procure un dispositif de dialyse comportant une
15 cellule avec deux compartiments séparés par une membrane de dialyse appropriée. On introduit un volume V d'un mélange albumine/principe actif dans le compartiment 1 et dans le compartiment 2, on introduit le même volume V de tampon de dialyse (tampon phosphate défini ci-dessus). Une
20 fois l'équilibre atteint, au bout de quelques heures, le compartiment 1 comprend le principe actif non lié et celui lié à l'albumine et le compartiment 2, le principe actif non lié. Des échantillons sont prélevés de chaque compartiment 1 et 2 et la radioactivité est mesurée par
25 scintillation liquide. Ces mesures permettent de déterminer les concentrations respectives en principes actifs liés et non liés à l'albumine.

Le Tableau 10 donne les résultats des pourcentages de [14 C]diazepam lié à l'albumine obtenus en considérant
30 respectivement les compositions A'4, A''4 et A'''4 dans lesquelles des volumes croissants en principe actif ont été ajoutés. Le Tableau 11 présente les résultats obtenus en considérant la [14 C]warfarine à la place du [14 C]diazepam. Les résultats représentent la valeur moyenne
35 de 5 essais.

Tableau 10

Compositions d'albumine	Concentration totale du $[^{14}\text{C}]$ diazepam (μm)	Pourcentage de $[^{14}\text{C}]$ diazepam lié à l'albumine
A'4	1,68 \pm 0,06	80,9 \pm 1,46
	4,17 \pm 0,28	82,34 \pm 1,92
	8,04 \pm 0,24	78,08 \pm 1,83
	40,09 \pm 1,28	57,18 \pm 2,14
	65,27 \pm 3,46	48,58 \pm 1,49
	115,02 \pm 4,83	36,38 \pm 1,69
A"4	1,09 \pm 0,23	34,46 \pm 2,04
	5,52 \pm 0,53	32,26 \pm 1,34
	21,95 \pm 0,42	31,00 \pm 0,93
	42,84 \pm 5,67	31,85 \pm 2,99
	85,00 \pm 13,6	30,12 \pm 2,00
	109,79 \pm 10,96	29,12 \pm 2,67
A'''4	1,23 \pm 0,09	38,47 \pm 1,88
	2,91 \pm 0,21	40,93 \pm 4,83
	11,55 \pm 0,19	37,85 \pm 1,25
	44,98 \pm 3,14	34,96 \pm 0,6
	86,09 \pm 5,01	33,04 \pm 1,17
	107,97 \pm 9,43	30,74 \pm 1,78

Les résultats montrent que plus la concentration en $[^{14}\text{C}]$ diazepam augmente dans la composition d'albumine A'4, plus le pourcentage de $[^{14}\text{C}]$ diazepam lié à l'albumine diminue. Ceci met évidence la présence dans l'albumine d'un site ou liaison saturable et d'une liaison non saturable.

L'augmentation de la concentration en $[^{14}\text{C}]$ diazepam dans les compositions d'albumine A"4 et A'''4, conduit à des pourcentages de $[^{14}\text{C}]$ diazepam lié à l'albumine sensiblement constants. Le site de fixation identifié pour l'albumine A nanofiltrée sans stabilisants de la

composition A'4 n'est donc plus fonctionnel car occupé par le stabilisant.

Tableau 11

5

Compositions d'albumine	Concentration totale de la [¹⁴ C]warfarine (μm)	Pourcentage de la [¹⁴ C]warfarine liée à l'albumine
A'4	1,99 ± 0,19	93,32 ± 0,49
	10,12 ± 0,71	91,75 ± 0,75
	34,29 ± 2,28	83,43 ± 1,11
	62,73 ± 3,55	71,74 ± 1,20
	103,66 ± 4,24	55,34 ± 2,94
	123,43 ± 8,07	47,83 ± 2,03
A"4	1,71 ± 0,19	88,18 ± 0,82
	8,35 ± 1,13	87,61 ± 0,84
	30,97 ± 2,98	81,14 ± 2,07
	54,40 ± 10,02	73,24 ± 3,46
	102,08 ± 14,70	57,02 ± 4,36
	119,90 ± 6,96	53,11 ± 3,46
A'''4	1,69 ± 0,08	88,58 ± 0,32
	8,33 ± 0,30	87,66 ± 0,28
	31,65 ± 0,72	80,39 ± 0,89
	57,17 ± 3,81	71,01 ± 1,68
	104,64 ± 6,28	55,04 ± 0,68
	127,98 ± 4,83	49,77 ± 2,66

Les résultats indiqués dans ce tableau montrent que les pourcentages de [¹⁴C]warfarine liée à l'albumine varient en fonction de l'augmentation de la concentration en [¹⁴C]warfarine dans les trois compositions d'albumine considérées. Le site de fixation de l'albumine n'est donc pas saturé par le stabilisant.

La comparaison des résultats figurant aux Tableaux 10 et 11 démontre que l'albumine se comporte différemment

vis-à-vis des médicaments considérés. Ceci s'expliquerait par la structure des médicaments considérés en rapport avec la configuration des sites de fixation de l'albumine. Ces études ont également permis de déterminer les
5 différentes constantes de liaison (K_a) des deux médicaments sur les différentes albumines A'4, A"4 et A'''4, figurant au Tableau 12.

Tableau 12

10

Composition d'albumine	K_a [^{14}C]diazepam (mM^{-1})	K_a [^{14}C]warfarine (mM^{-1})
A'4	187	215
A"4	4,2	135
A'''4	3,35	118

Exemple 13

La capacité de stabilisation du facteur von Willebrand (fvW) par l'albumine nanofiltrée a été évaluée par des
15 essais de chauffage à sec du fvW à 80°C pendant 72 heures. Sur la base d'essais préliminaires, il a été trouvé que l'ajout d'un mélange d'excipients judicieusement choisis tel que de glycine et d'arginine, à une solution de fvW, permettait sa stabilisation au cours du chauffage à sec
20 (80°C, 72 heures). Bien que l'activité du fvW (fvW:Ag) était conservée (> 82%, par rapport au fvW non chauffé), son profil multimérique n'était en revanche pas maintenu, ce qui était observé par la disparition de multimères de hauts poids moléculaires (> 10), responsables de l'effet
25 thérapeutique du fvW.

Pour pallier cet inconvénient, trois solutions de 1 g/l de fvW ont été préparées en présence de glycine et d'arginine, et d'albumine nanofiltrée A à usage thérapeutique. Les caractéristiques des solutions ainsi
30 obtenues, A10, A11 et A12, figurent au Tableau 13.

Tableau 13

Solutions	Albumine (g/l)	Glycine (g/l)	Arginine (g/l)
A10	15	5	40
A11	15	10	40
A12	15	5	30

5 Celles-ci sont ensuite soumises à une lyophilisation
 (45 ± 3 h) et à un chauffage à sec défini plus haut. Après
 le chauffage, l'ajout d'eau purifiée pour injection (PPI)
 dans les résidus secs, permet de reconstituer les
 solutions A11-A12. On procède à l'analyse des paramètres
 10 suivants : aspect de la solution, temps de dissolution,
 activité du fvW et profil multimérique, mesuré par
 électrophorèse. Le Tableau 14 présente les résultats
 obtenus.

Tableau 14

15

Solutions	Aspect de la solution	Temps de dissolutio n (min)	fvW:Ag (%)**	Profil multimérique
A10	L*	< 1	91	C***
A11	L*	< 1	89	C***
A12	L*	< 1	87	C***

* : limpide, sans particules visibles

** : rapport entre l'activité du fvW chauffé et celle du
fvW non chauffé

*** : Conforme au produit de départ (avant chauffage)

20

Ces résultats indiquent que la présence d'albumine non
 seulement n'induit pas d'effet négatif sur la
 stabilisation au chauffage du fvW, ce qui se traduit par
 un aspect limpide de solution (sans particules

observables), un temps de solubilisation très faible et surtout, la conservation de l'activité du fvW, mais qu'elle permet également de conserver l'intégrité de ses multimères de hauts poids moléculaires.

Revendications

1. Procédé de purification d'albumine caractérisé en ce qu'il comprend une étape consistant à soumettre une
5 solution aqueuse d'albumine, de concentration 15 g/l à 80 g/l et de pH non inférieur à 7, à une nanofiltration dans une plage de température allant de 15°C à 55°C.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la nanofiltration est effectuée sur un filtre qualifié
10 pour une porosité d'au moins 13 nm.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le pH de la solution aqueuse d'albumine est situé dans la plage de valeurs allant de 7,8 à 11,5, et, de préférence, de 9 à 10,5.

15 4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape d'ajout d'un sel ou mélange de sels pharmaceutiquement acceptables dans la solution aqueuse d'albumine pour obtenir une solution de force ionique située dans la plage
20 allant de 0,01 à 0,55.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le sel pharmaceutiquement acceptable est un sel d'un métal alcalin.

25 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le sel d'un métal alcalin est le chlorure de sodium présent en quantité conférant à la solution d'albumine une force ionique de 0,15.

30 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la concentration de la solution aqueuse d'albumine est située dans la plage allant de 40 g/l à 60 g/l.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la température de la solution aqueuse d'albumine est comprise entre 30°C et 55°C.

35 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la nanofiltration de la

solution aqueuse d'albumine est effectuée en deux étapes successives sur respectivement deux filtres de porosité décroissante.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en
5 ce que les deux étapes successives de nanofiltration sont effectuées respectivement sur des filtres de porosité de 23 à 50 nm et 15 ou 20 nm.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications
1 à 10, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre avec des
10 filtres en cellulose régénérée de 15 nm et de surface 0,01 m², à une pression non supérieure à 1 bar.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la pression est située dans la plage allant de 0,2 à 0,8 bar.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications
1 à 12, caractérisé en ce que l'albumine est obtenue par
15 extraction éthanolique et/ou par purification par chromatographie d'échange d'ions ou d'affinité.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications
20 1 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend une étape ultérieure de traitement d'adaptation de la solution aqueuse d'albumine à un usage thérapeutique.

15. Solution aqueuse d'albumine viralement sécurisée susceptible d'être obtenue par la mise en oeuvre du
25 procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, dans laquelle les sites de transport et de fixation de principes actifs thérapeutiques de l'albumine sont disponibles.

16. Solution aqueuse d'albumine selon la revendication
30 15, caractérisée en ce qu'elle contient au plus 1% de polymères d'albumine de taille inférieure à 100 nm.

17. Solution aqueuse d'albumine selon la revendication 15 ou 16, caractérisée en ce qu'elle contient au plus 1% de polymères d'albumine de taille inférieure à 20 nm.

18. Composition d'albumine à usage thérapeutique
35 obtenue par un traitement, selon la revendication 14,

d'adaptation d'une solution aqueuse d'albumine, selon l'une quelconque des revendications 15 à 17, à un usage clinique.

19. Utilisation d'une composition d'albumine à usage
5 thérapeutique selon la revendication 18, pour la stabilisation d'au moins un membre choisi dans le groupe constitué par les protéines de faible concentration et d'activité spécifique élevée, les immunoglobulines spécifiques, les anticorps monoclonaux, les vaccins, les
10 allergènes, les cytokines et les hormones peptidiques.

20. Utilisation selon la revendication 19, caractérisée en ce que les protéines représentent le facteur VIII ou le facteur von Willebrand et leur équivalent recombinant.

15 21. Utilisation d'une composition d'albumine à usage thérapeutique selon la revendication 18, pour le transport et la fixation de principes actifs thérapeutiques.

22. Utilisation d'une composition d'albumine à usage thérapeutique selon la revendication 18, comme excipient
20 pour un milieu d'incubation pour la fécondation "in vitro" d'ovocytes humains.

23. Utilisation d'une composition d'albumine à usage thérapeutique selon la revendication 18, comme protéine standard témoin.

1/6

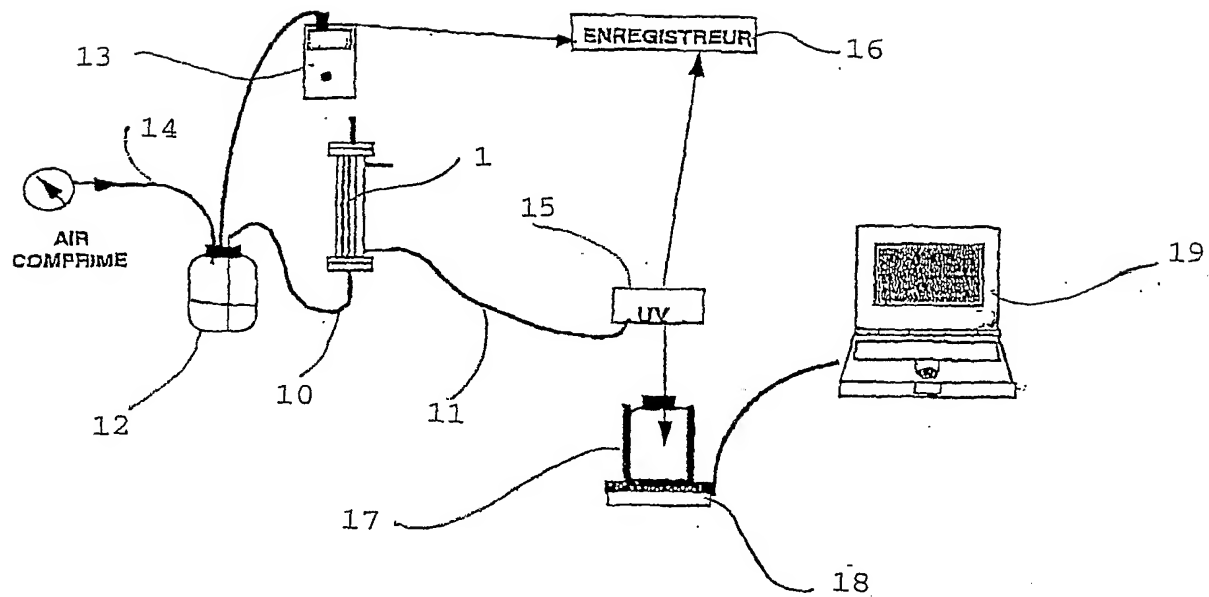
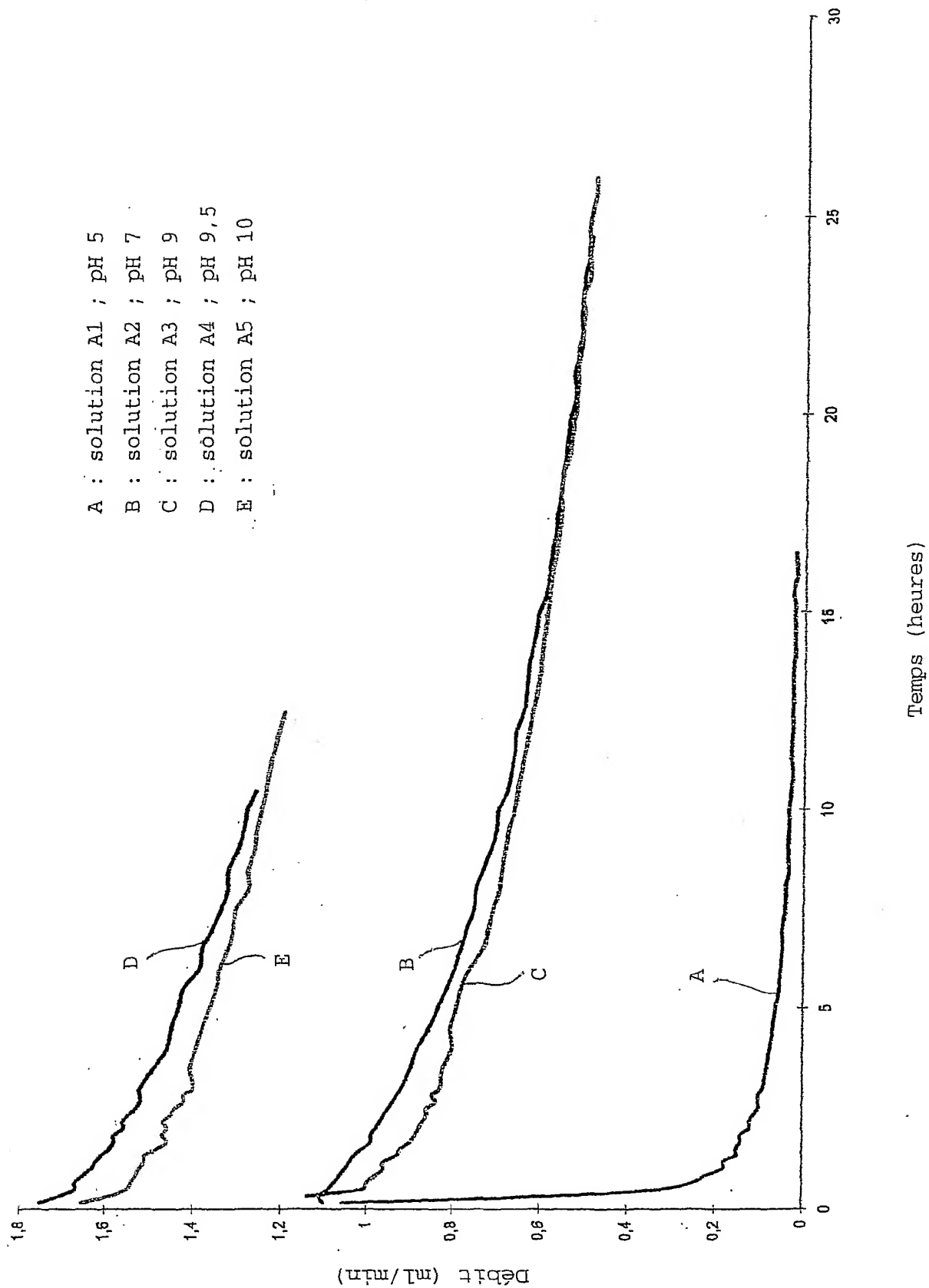


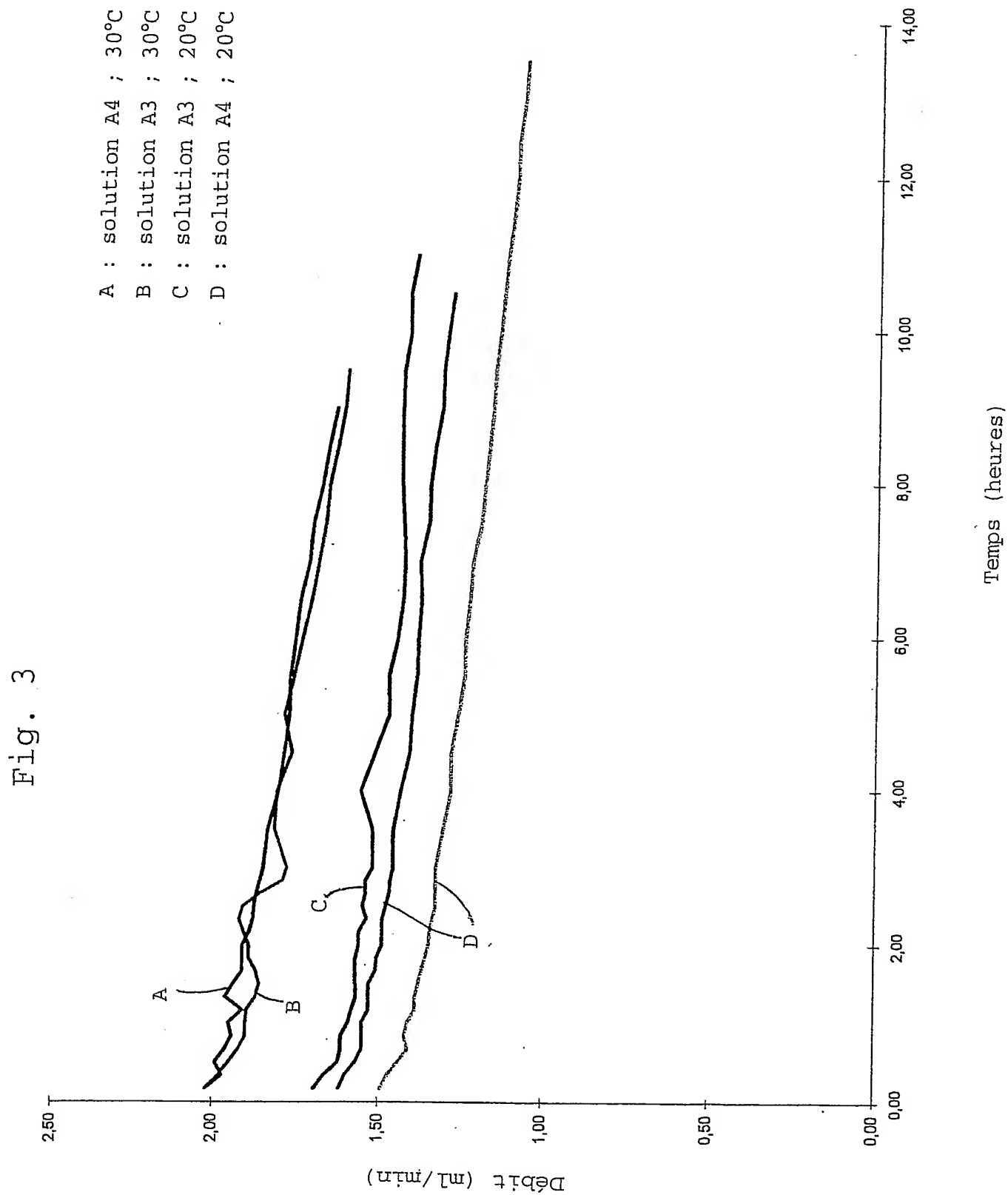
Fig. 1

2/6

Fig. 2



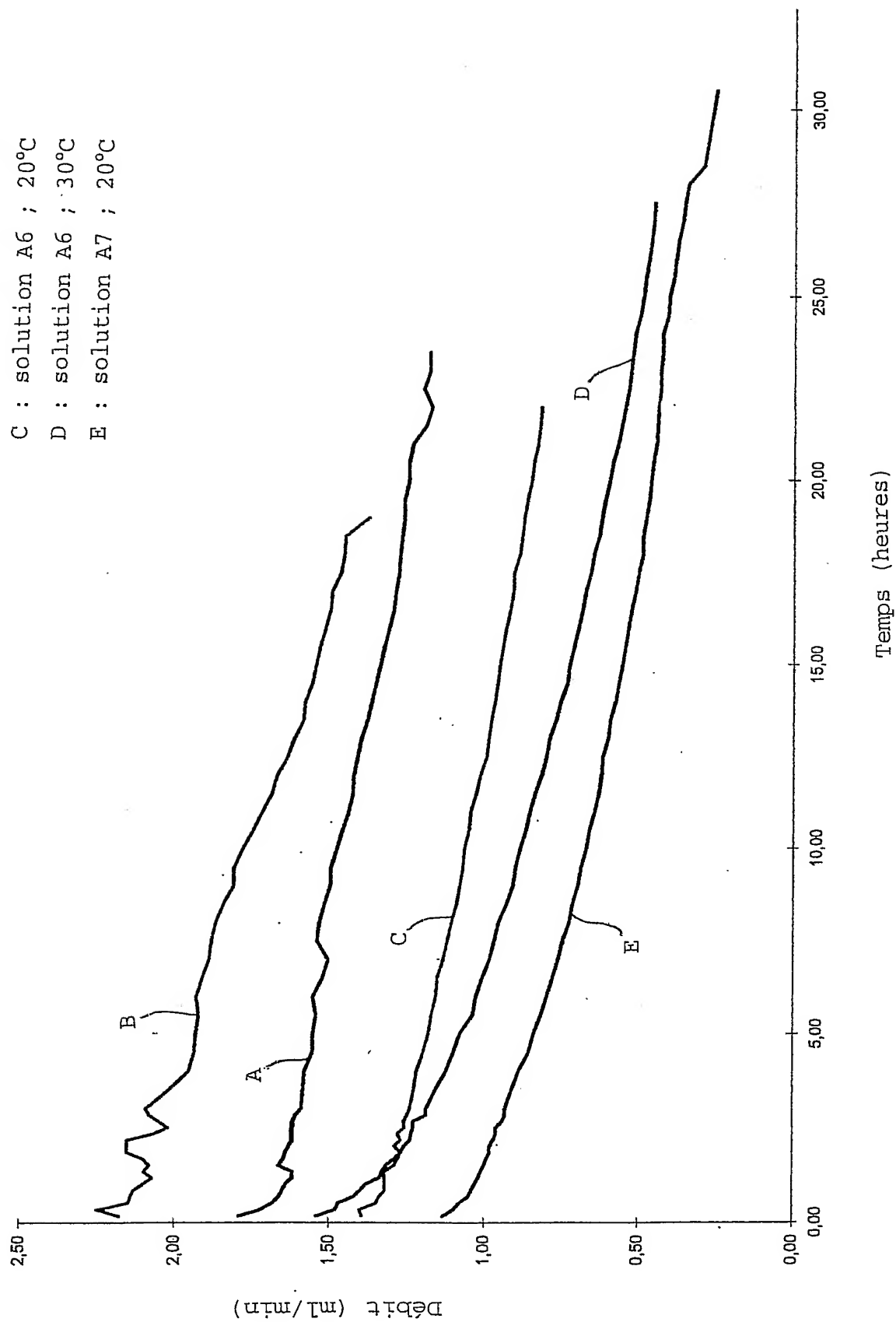
3/6



4 / 6

Fig. 4

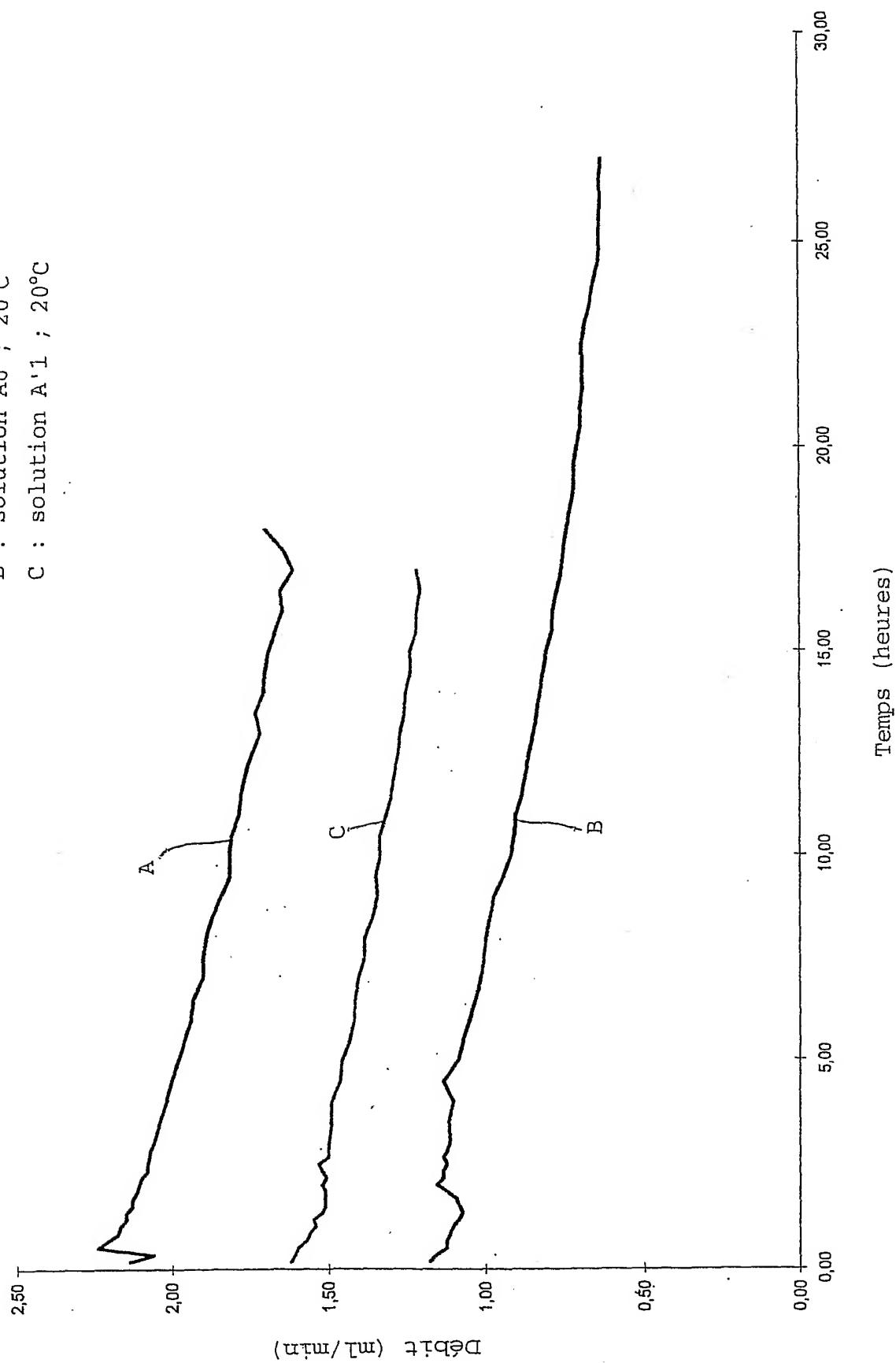
A : solution A4 ; 20°C
B : solution A4 ; 30°C
C : solution A6 ; 20°C
D : solution A6 ; 30°C
E : solution A7 ; 20°C



5/6

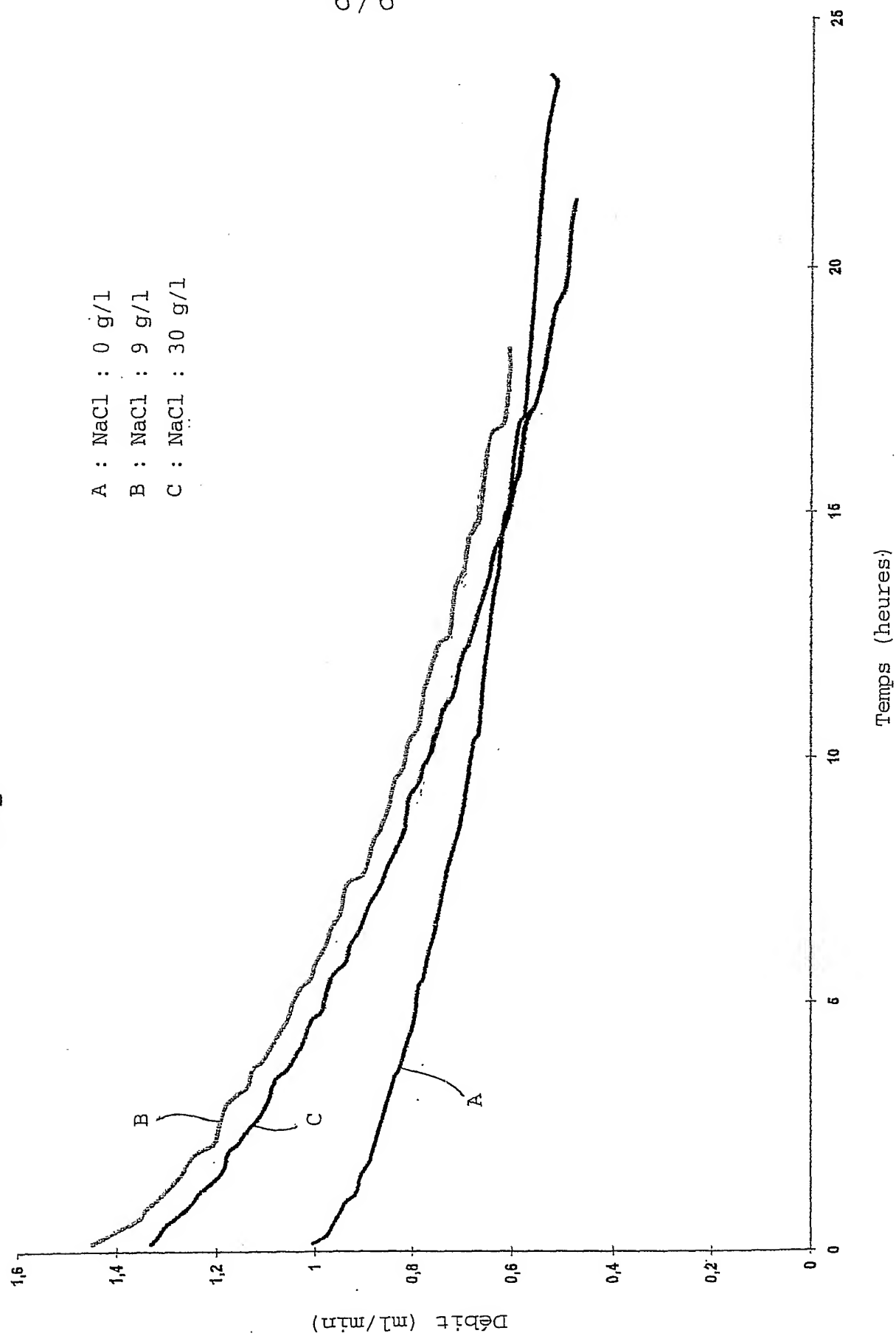
Fig. 5

A : solution A4 ; 30°C
B : solution A6 ; 20°C
C : solution A'1 ; 20°C



6/6

Fig. 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/76 C07K14/765

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 498 133 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS) 12 August 1992 (1992-08-12) example 1	15-23
X	EP 1 329 461 A (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC INSTITUTE KUMAMOTO-SHI) 23 July 2003 (2003-07-23) example 1	15-23
X	EP 1 329 460 A (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC INSTITUTE KUMAMOTO-SHI) 23 July 2003 (2003-07-23) example 3	15-23
X	WO 96/00237 A (PHARMACIA AB) 4 January 1996 (1996-01-04) examples 12,19	1-14

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 June 2005

Date of mailing of the international search report

06/07/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Masturzo, P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/000416

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>BIOLOGICALS., vol. 29, no. 1, 2001, pages 17-25, XP002285689 GB ACADEMIC PRESS LTD., LONDON. the whole document -----</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/FR2005/000416

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0498133	A	12-08-1992	FR 2672604 A1	14-08-1992
			AT 179717 T	15-05-1999
			AU 656552 B2	09-02-1995
			AU 1003892 A	13-08-1992
			CA 2058676 A1	08-08-1992
			DE 69229068 D1	10-06-1999
			DE 69229068 T2	05-01-2000
			DK 498133 T3	15-11-1999
			EP 0498133 A1	12-08-1992
			ES 2134766 T3	16-10-1999
			GR 3030907 T3	30-11-1999
			JP 3438735 B2	18-08-2003
			JP 5086097 A	06-04-1993
			US 5346992 A	13-09-1994
EP 1329461	A	23-07-2003	JP 2002128795 A	09-05-2002
			AU 1093502 A	06-05-2002
			CA 2395589 A1	02-05-2002
			EP 1329461 A1	23-07-2003
			US 2002183492 A1	05-12-2002
			CN 1406245 A	26-03-2003
			WO 0234786 A1	02-05-2002
EP 1329460	A	23-07-2003	JP 2002128793 A	09-05-2002
			JP 2002128794 A	09-05-2002
			AU 1093402 A	06-05-2002
			CA 2395587 A1	02-05-2002
			EP 1329460 A1	23-07-2003
			US 2003027991 A1	06-02-2003
			CN 1406247 A	26-03-2003
			WO 0234785 A1	02-05-2002
WO 9600237	A	04-01-1996	SE 502820 C2	22-01-1996
			AT 212354 T	15-02-2002
			AU 682274 B2	25-09-1997
			AU 2813295 A	19-01-1996
			CA 2192683 A1	04-01-1996
			DE 69525176 D1	14-03-2002
			DE 69525176 T2	27-06-2002
			DE 796269 T1	02-01-1998
			DK 796269 T3	06-05-2002
			EP 0796269 A1	24-09-1997
			ES 2105992 T1	01-11-1997
			FI 965145 A	20-12-1996
			GR 97300038 T1	28-11-1997
			JP 10502074 T	24-02-1998
			NO 965523 A	20-12-1996
			NZ 288789 A	19-12-1997
			PT 796269 T	28-06-2002
			SE 9402254 A	24-12-1995
			WO 9600237 A1	04-01-1996
			US 2003191292 A1	09-10-2003
			US 6399357 B1	04-06-2002
			US 6486306 B1	26-11-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2005/000416

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C07K14/76 C07K14/765

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C07K A61K C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 498 133 A (PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS) 12 août 1992 (1992-08-12) exemple 1	15-23
X	EP 1 329 461 A (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC INSTITUTE KUMAMOTO-SHI) 23 juillet 2003 (2003-07-23) exemple 1	15-23
X	EP 1 329 460 A (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC INSTITUTE KUMAMOTO-SHI) 23 juillet 2003 (2003-07-23) exemple 3	15-23
X	WO 96/00237 A (PHARMACIA AB) 4 janvier 1996 (1996-01-04) exemples 12,19	1-14

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 juin 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/07/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Masturzo, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2005/000416

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>BIOLOGICALS., vol. 29, no. 1, 2001, pages 17-25, XP002285689 GB ACADEMIC PRESS LTD., LONDON. le document en entier -----</p>	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2005/000416

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0498133	A	12-08-1992	FR 2672604 A1	14-08-1992
			AT 179717 T	15-05-1999
			AU 656552 B2	09-02-1995
			AU 1003892 A	13-08-1992
			CA 2058676 A1	08-08-1992
			DE 69229068 D1	10-06-1999
			DE 69229068 T2	05-01-2000
			DK 498133 T3	15-11-1999
			EP 0498133 A1	12-08-1992
			ES 2134766 T3	16-10-1999
			GR 3030907 T3	30-11-1999
			JP 3438735 B2	18-08-2003
			JP 5086097 A	06-04-1993
			US 5346992 A	13-09-1994
EP 1329461	A	23-07-2003	JP 2002128795 A	09-05-2002
			AU 1093502 A	06-05-2002
			CA 2395589 A1	02-05-2002
			EP 1329461 A1	23-07-2003
			US 2002183492 A1	05-12-2002
			CN 1406245 A	26-03-2003
			WO 0234786 A1	02-05-2002
EP 1329460	A	23-07-2003	JP 2002128793 A	09-05-2002
			JP 2002128794 A	09-05-2002
			AU 1093402 A	06-05-2002
			CA 2395587 A1	02-05-2002
			EP 1329460 A1	23-07-2003
			US 2003027991 A1	06-02-2003
			CN 1406247 A	26-03-2003
			WO 0234785 A1	02-05-2002
WO 9600237	A	04-01-1996	SE 502820 C2	22-01-1996
			AT 212354 T	15-02-2002
			AU 682274 B2	25-09-1997
			AU 2813295 A	19-01-1996
			CA 2192683 A1	04-01-1996
			DE 69525176 D1	14-03-2002
			DE 69525176 T2	27-06-2002
			DE 796269 T1	02-01-1998
			DK 796269 T3	06-05-2002
			EP 0796269 A1	24-09-1997
			ES 2105992 T1	01-11-1997
			FI 965145 A	20-12-1996
			GR 97300038 T1	28-11-1997
			JP 10502074 T	24-02-1998
			NO 965523 A	20-12-1996
			NZ 288789 A	19-12-1997
			PT 796269 T	28-06-2002
			SE 9402254 A	24-12-1995
			WO 9600237 A1	04-01-1996
			US 2003191292 A1	09-10-2003
			US 6399357 B1	04-06-2002
			US 6486306 B1	26-11-2002